

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-086696

(43)Date of publication of application : 28.03.2000

---

(51)Int.Cl. C07K 14/37  
A61P 31/04  
A61K 45/00  
// C12P 21/00

---

(21)Application number : 10- 253424 (71)Applicant : KAJI AKIRA

(22)Date of filing : 08.09.1998 (72)Inventor : KAJI AKIRA  
ANDERS  
RIRUJAS

---

**(54) RIBOSOME RECYCLING FACTOR(RRF) PROTEIN CRYSTAL AND APPLICATION TO RATIONAL DRUG DESIGN BASED ON THREE- DIMENSIONAL STRUCTURAL INFORMATION OBTAINED FROM THE CRYSTAL**

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain an RRF protein crystal useful for elucidating a stereostructure of ribosome recycling factor(RRF), developing various antimicrobial agents, herbicides, or the like, because of an RRF of orthorhombic system.

SOLUTION: This RRF protein crystal is crystallized by a hanging drop vapor diffusion technique method, is of orthorhombic system, has a space group P21212 and a  $30 \times 50 \times 250 \mu\text{m}$  size. RRF is derived from a microorganism X and the crystal is any of crystal of RRF protein itself, crystal of RRF variant, crystal of RRF protein homolog, crystal of RRF protein variant, crystal of RRF protein homolog and crystal of RRF protein cocomplex. In designing a compound to be bonded to the active site of the RRF protein, in order to evaluate its chemical experimental body, preferably structural information obtained from the crystal of the RRF protein is used.

---

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's  
decision of rejection]

[Kind of final disposal of  
application other than the  
examiner's decision of rejection or  
application converted registration]

[Date of final disposal for  
application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against  
examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against  
examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-86696

(P2000-86696A)

(43) 公開日 平成12年3月28日 (2000.3.28)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード <sup>*</sup> (参考)
C 0 7 K 14/37		C 0 7 K 14/37	4 B 0 6 4
A 6 1 P 31/04		A 6 1 K 31/00	6 3 1 C 4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/00		45/00	4 H 0 4 5
// C 1 2 P 21/00		C 1 2 P 21/00	B

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平10-253424  
 (22) 出願日 平成10年9月8日 (1998.9.8)

(71) 出願人 59188479  
 梶 昭  
 東京都東久留米市大門町1丁目1番9号  
 (72) 発明者 梶 昭  
 東京都東久留米市大門町1丁目1番9号  
 (72) 発明者 アンダース・リルジャス  
 スウェーデン国 ルンド、S-221、ルン  
 ド大学生物物理学部、ボックス124  
 (74) 代理人 100102842  
 弁理士 葛和 清司 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リボソームリサイクリング因子 (RRF) タンパクの結晶及び該結晶から得られる三次元構造情報に基づくラシヨナルドラッグデザインへの応用

(57) 【要約】

【課題】 RRFタンパク結晶及びその立体構造を提供する。さらに、RRFタンパクの構造情報を応用した次世代抗菌剤、除草剤を開発する技術を提供する。

【解決手段】 XRRFタンパク結晶をX線回折法により三次元構造解析することにより、阻害メカニズムを究明してRRF阻害による次世代抗生物質及び除菌剤開発、特にラシヨナルドラッグデザインにより抗菌剤を開発する際の一つの指標とする。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 斜方晶系のRRFタンパク結晶。

【請求項2】 滴状蒸気拡散法により結晶化された、請求項1に記載のRRFタンパク結晶。

【請求項3】 空間群 $P2_12_12$ を有する、請求項1又は2に記載のRRFタンパク結晶。

【請求項4】  $30 \times 50 \times 250 \mu\text{m}$ の大きさを有する、請求項1〜3のいずれかに記載のRRFタンパク結晶。

【請求項5】 RRFが菌X由来のものである、請求項1〜4のいずれかに記載のRRFタンパク結晶。

【請求項6】 結晶がRRFタンパク自体の結晶、RRFタンパク変異体の結晶、RRFタンパクホモログの結晶及びRRFタンパクの複合体の結晶のいずれかである、請求項1に記載のRRFタンパク結晶。

【請求項7】 請求項1に記載のRRFタンパク結晶の、白金又は水銀による重原子誘導体。

【請求項8】 RRFタンパクの活性部位と結合し得る化合物を設計するに際し、その化学的実体をコンピュータ評価するための、請求項1に記載のRRFタンパク結晶から得られる構造情報の使用。

【請求項9】 活性部位に結合する化学的実体により特徴付けられる化合物が、RRFタンパクの阻害物質である、請求項8に記載の構造情報の使用。

【請求項10】 前記阻害物質がRRFの競合的、非競合的又は不競合的阻害物質である、請求項8に記載の構造情報の使用。

【請求項11】 請求項9に記載の構造情報の使用により得られる、RRFタンパクの阻害物質。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、リボソームリサイクリング因子 (Ribosome recycling factor, 以下RRF) の結晶に関する。また本発明は、該結晶のX線回折により得られるRRFタンパクの立体構造に関する。さらに本発明は、RRFタンパクの構造情報を応用した次世代抗菌剤、除草剤を開発する技術に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 蛋白質合成は、すべての細胞の生命活動において必要不可欠な機能であり、「開始」、「伸長」、「終結」及び「リボソームリサイクリング」の四段階から成り立っている。蛋白質合成における最終的なステップ (第4ステップ) は、次の「開始」段階へリボソームを再利用する為に、メッセンジャー-RNA、転移RNA、リボソームからなる終核複合体を各々遊離、解離させることにより終了する。原核生物である大腸菌においては、このリボソームの「再利用」はリボソームリサイクリング因子 (Ribosome recycling factor, 以下RRF) とエロンゲーション因子G (elongation factor G, 以下EFG) により触媒されることが分かっている。このリボソーム「再利用」の過程はJanosi博士らによる総説 (19

96 Adv. Biophys. 32:121-201) において紹介されている。真核生物において蛋白質翻訳終核複合体の解離はRRFではない他の因子により触媒される可能性が示唆されており、真核生物のmRNAはモノシストロニックで原核生物のそれはポリシストロニックである (Kozak 1987, Mol. Cell. Biol. 7:3438-3445; Das 1984, Nucleic Acids Res. 12:4757-4768; Schoner 1986 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83:8506-8510; Sprengel 1985 Nucleic Acids Res. 13:893-909) ことから、真核生物においてリボソームのmRNAよりの解離が阻害されても下流のシストロンに影響することはない。このように真核生物における蛋白質合成の最終段階にあたる蛋白質翻訳終核複合体の解離という第4段階が原核生物のものとは異なると考えられるので、特に新しい型の抗生物質のターゲットとして期待されている。

【0003】 一方、現在では数多くの抗菌剤が開発されており、この中には例えば高い殺菌作用を示すものも存在している。しかし、このようにして得られた抗菌剤には、その作用部位が不明なままのものも多く存在する。これまでは、これらの活性を示す抗菌剤をランダムスクリーニングの材料として用い、構造活性関係を樹立しつつさらなる効用のあるものを開発していく方法が中心であったが、これには莫大な時間と労力を要する。

【0004】 そこで近年、この問題を排除し能率良く阻害剤の発見が行われることを目的としてデータベース化が図られている。それを基本にしてラショナルドラッグデザイン法が検討され開発されつつある。この例として、最近上市された抗HIV剤であるプロテアーゼの阻害剤が挙げられる。HIVのプロテアーゼは結晶化され、その立体構造が知られている。この構造と活性部位の三次元構造アミノ酸配列を基にしてコンピュータより既知の化合物からこの部位に最も親和性の高いものを選び、その阻害活性が測定されている。活性の出たものと標的蛋白の共結晶を作り、三次元構造の測定を行うことによりさらによく結合する化合物を予測できるので、これを合成しその阻害活性が測定されている。そして再びこの物質と標的蛋白との共結晶を作り、上記の過程を繰り返すことにより極めて有効な物質を得ることができる。

【0005】 ところで、上記のような従来の抗生物質への耐性獲得菌株が数多く報告されてきており、細菌の発育を直接的に制限し得る部位を標的とする、新たな抗生物質の開発が早急に必要とされている。そこで本発明者らは前記RRFが抗菌剤の新たなターゲットとなり得ることに着目し鋭意研究を進めてきたが、この着想が近年脚光を浴びつつある。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】 RRFに関して、本発明者らはこれまで大腸菌を始め、原核生物のみに留まらず真核生物に関するものまで数種の遺伝子配列を決定し

3

た(特開平3-200797、PCT/JP98/00734、特願平10-150493)。従って、そこから得られるアミノ酸配列によりその二次構造までが推定可能ではある。しかしながら、現在の技術水準においては、この二次構造から実際の立体構造を同定するまでには至っていない。実際のタンパクにおいては各アミノ酸残基が相互的に作用しており、また場合によってはさまざまな修飾を受けてその立体構造を形成している。従ってタンパクの立体構造が分れば、そのリガンドとなりうる物質を創製することが可能であり、この意味で有用な抗生物質を創製するためには、結晶化による三次元構造の決定がきわめて重大な意義を有することとなる。従って本発明の課題は、RRFの立体構造を解明し、種々の抗菌剤及び除草剤の開発に寄与することにある。

#### 【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記の現状を踏まえ、RRFに関し研究を進める中で、RRFの結晶を得てその立体構造を同定することに初めて成功し、さらに研究を進めた結果、本発明を完成するに至った。即ち本発明は、RRFタンパクの結晶及びその製法と立体構造に関する。より具体的には斜方晶系、特にその空間群P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2を有するRRFタンパク結晶に関する。さらに本発明は、該結晶と白金、水銀などの重原子誘導体に関する。また本発明はRRFタンパクの構造情報を使用して、RRFタンパクの活性部位と結合し得る化合物又はRRFタンパクを非競合的に又は不競合的に阻害し得る化合物をコンピュータ評価して、次世代抗菌剤、除草剤を開発する技術に関する。さらに又本発明は、RRFの立体構造に基づく阻害剤の発見を目的としてデータベース化し、それを基本にしてラショナルドラッグデザイン法に応用することにも関する。

【0008】RRFが理想的な抗菌剤の標的であることが推定される現在、本発明により解明されたRRFの三次元構造は、抗菌剤などの開発に直結しているので、産業上極めて重要である。しかも多くの病原菌のRRFの一次構造が類似していることが知られていることから(例えば緑膿菌のRRFは大腸菌のそれと60%の相同性を有する)、本発明によるRRFの三次元構造の初期データにより、他の病原菌のRRFの三次元構造についてもその解明が極めて容易になる。従って、種特異性の抗菌剤を開発するためにも、本発明は、RRF阻害による次世代抗生物質及び除草剤開発に、特にラショナルドラッグデザインにより抗菌剤を開発する際の一つの指標として極めて有用である。

【0009】本発明の実施例においては、X線のRRF(該RRFの一次構造については本発明者らによるPCT/JP98/00734参照)を用いて結晶化し、構造解析を行ったが、その他のRRFについても同様に実施することができ。また結晶化に際してはRRFタンパク自体のみならず、RRFタンパク変異体、RRFタンパクホモログ、RRFタンパク共複合

4

体を結晶化し、それぞれ構造解析することも可能である。以下、実施例により本発明をより詳細に示す。以下に示す実施例はあくまでその詳細な解説を目的とするものであり、他の方法を制限するものではない。

#### 【0010】

【実施例】例1 滴伏蒸気拡散法(hanging drop vapour diffusion technique)によるRRFタンパクの結晶化  
菌XのRRFタンパク4mg/mlから8mg/ml、トリス塩酸 50mM pH8.5、硫酸塩 70-100mM、ポリエチレングリコール14%から18%を含む5μlの溶液を液滴化し、液滴よりも高い濃度の結晶化試薬を含有する液だまりで平衡化した。平衡化は揮発性媒体(水又は有機溶媒)の拡散により、液滴の蒸気圧が液だまりの蒸気圧に等しくなるまで行った。平衡化は水交換(液滴から液だまりへ)によりおきると、液滴の容量は変化する。その結果、液滴中の全ての媒体の濃度は変化する。水よりも高い蒸気圧を有する媒体には、液だまりから液滴への変換が生起する。本例においてRRFタンパク溶液が接触するガラス容器は、その表面を疎水化処理を用いられる。トリス塩酸 100mM pH8.5硫酸塩 50mMから200mM、ポリエチレングリコール28%から36%の緩衝液へ透析してXRRF結晶を得た。結晶は、1から3週間で30×50×250μmの大きさに成長した。その結果を図1に示す。

【0011】例2 X線回折解析によるRRFの三次元構造  
RRF三次元構造決定の手段として、複合同位体置換法(multiple isomorphous replacement procedure)を用いた。これは、重原子による同位体タンパク結晶からの拡散データを得るのに必要な標準的な方法である。重原子の位置より、未置換のものと同位体との差をパターンゾン・マップへ計算した。タンパクモデル作成にあたり電子密度図の計算に必要な初期タンパク相のデータは、数種の誘導体を用いて計算された。この凍結結晶のX線回折データは、Maxi synchrotron (Sweden, Lund)によりBL11へ集めた。そのネイティブな結晶は2.6Åの解像度で回折した。1.5Å以上のモザイク性の問題のために、現在までの所2.9Åの解像度までを用いた。この典型的な回折像を図2に示す。このネイティブデータ解析は終了しており、R<sub>sym</sub>が1.0である。この統計データを表1に示す。この結晶は、a=98.5Å、b=106.7Å、c=66.7Åを有し、P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2に属している。この非対称のユニットは2から4分子を含んでおり、各分子間には0.5、0.3、0.5のトランスレーションが存在する。2つの誘導体のデータが得られ、プラチナの誘導体は4.0Åに回折し、水銀の誘導体は3.8Åに回折した。

【0012】ネイティブデータの統計学的検討  
回折強度の要約とR-因子をシェルの大きさ(解像度)により示した表

Rの値(一次関数として)= $3D \sum (|ABS(I) - \langle I \rangle|) / \sum (I)$   
Rの値(二次関数として)= $3D \sum ((I - \langle I \rangle)^2) / \sum (I)$

UM (I \*\* 2)

\* った。

カイ自乗=3D SUM ( (I - &lt;I&gt;) \*\* 2) / (エラー\*\* 2 \*

【0013】

N / (N-1) ) )

【表1】

全ての和の計算には二度以上測定した値についてのみ行 \*

表1

シェルの下限及び上限 回折強度の 平均の 正常の 一次乗数の 二次乗数の

オングストローム 平均 誤差 stat. 値 カイ自乗値 R-因子 R-因子

下限 上限

30.0	7.12	814.6	36.6	18.5	0.709	0.033	0.032
7.12	5.67	227.1	16.7	13.5	1.012	0.084	0.072
5.67	4.95	266.0	19.0	15.3	0.983	0.083	0.075
4.95	4.50	417.3	25.3	18.4	1.052	0.070	0.064
4.50	4.18	394.0	25.5	19.5	1.239	0.087	0.086
4.18	3.93	330.4	24.4	19.7	1.064	0.093	0.088
3.93	3.74	296.1	24.6	20.9	1.286	0.125	0.219
3.74	3.58	283.8	25.5	22.0	1.275	0.142	0.221
3.58	3.44	207.5	23.2	21.2	1.314	0.170	0.192
3.44	3.32	173.2	22.5	21.1	1.278	0.193	0.298
3.32	3.22	151.8	22.1	20.9	1.414	0.222	0.231
3.22	3.12	130.4	21.7	20.8	1.560	0.265	0.280
3.12	3.04	108.3	20.6	19.9	1.552	0.306	0.307
3.04	2.97	92.2	19.9	19.2	1.655	0.334	0.315
2.97	2.90	74.9	19.2	18.7	1.632	0.411	0.416
全ての反射		268.4	23.2	19.3	1.259	0.119	0.102

【図面の簡単な説明】

【図1】XRRFタンパク結晶を示す写真図である。

【図2】XRRFタンパク結晶のX線回折像を示す写真図である。

回折像の詳細 : x11 to 1200 of 1200, y11 to 1200 of 1200

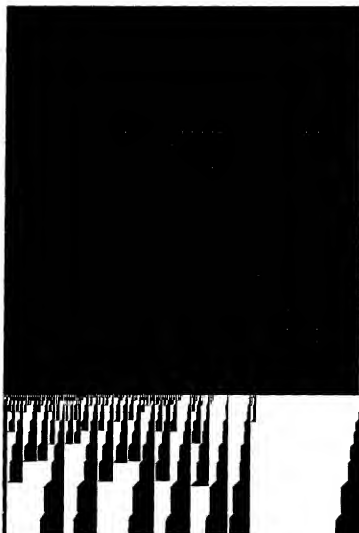
回折像の方向 : x1 to the right, y1 up

データのファイル順 : -x1 + y1

30 最大ピクセル値: 65535

スケールの限界: 最小=1、最大=1200、黒は回折強度の高い値を示す。

【図 1】



【図 2】



リボソーム・リサイクリング・ファクター

凍結結晶の回折像 (X11 II シンクロトロンより、ルンド、スウェーデン)

フロントページの続き

Fターム(参考) 4B064 AG01 BG09 BH20 CA01 CE06  
 CE15 DA01 DA11  
 4C084 AA07 AA17 BA33 BA44 CA04  
 DC50 ZB352  
 4H045 AA10 AA30 BA52 CA10 EA05  
 EA29 GA10 GA24